

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-46193

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)2月17日

C 07 K 3/20
// C 12 N 15/00

ZNA

7731-4H
8717-4B
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全7頁)

⑮ 発明の名称 DNA固定ミクロスフェア及びそれを用いるDNA転写制御因子精製法

⑯ 特 願 平2-148701

⑰ 出 願 平2(1990)6月8日

⑱ 発 明 者 川 口 春 馬 神奈川県横浜市旭区中沢町86-43
⑱ 発 明 者 猪 股 幸 雄 東京都東村山市青葉町3-4-26
⑱ 発 明 者 半 田 宏 東京都世田谷区桜上水1-17-16
⑲ 出 願 人 日本ゼオン株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目6番1号

明 細 書

1. 発明の名称

DNA固定ミクロスフェア及びそれを用いるDNA転写制御因子精製法

2. 特許請求の範囲

1. 表面がエポキシ基を有する樹脂から成る担体と特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列を有するDNA鎖が該エポキシ基を開環させて結合し、DNA鎖中の特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列部以外にはタンパク質を吸着しないDNA固定ミクロスフェア。

2. 特定のタンパク質が転写制御因子である請求項1記載のDNA固定ミクロスフェア。

3. 該表面がポリグリシジルメタクリレートから成る請求項1、または2記載のDNA固定ミクロスフェア。

4. 表面がエポキシ基を有する樹脂から成る担体と特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列を有するDNA鎖が該エポキシ基を開環させて結合し、DNA鎖中の特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列部以外にはタンパク質を吸着

しないDNA固定ミクロスフェアに、該DNA鎖を介して該タンパク質を吸着させ、他のタンパク質を除去した後、該タンパク質とDNA鎖を解離させる特定のタンパク質の精製法。

5. 特定のタンパク質が転写制御因子である請求項4記載の特定のタンパク質の精製法。

6. 該表面がポリグリシジルメタクリレートから成る請求項4、または5記載の特定のタンパク質の精製法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、タンパク質の精製法等に用いられるDNA固定ミクロスフェアに関する。さらに詳しくは、表面がエポキシ基を有する樹脂から成る担体と特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列を有するDNA鎖が該エポキシ基を開環させて結合し、DNA鎖中の特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列部以外にはタンパク質を吸着しないDNA固定ミクロスフェアに、該DNA鎖

を介して該タンパク質を吸着させ、他のタンパク質を除去した後、該タンパク質とDNA鎖を解離させる特定のタンパク質の精製において用いられるDNA固定ミクロスフェアに関する。

(従来の技術)

近年めざましく進歩する遺伝子工学の柱の一つに遺伝子自体の解析がある。その中で遺伝子における転写制御因子の解析は転写制御のメカニズムの解明につながるものであり、重要である。

転写とは遺伝子であるDNAからRNAポリメラーゼによってRNAが合成される過程であり、転写開始、延長、終結段階に分けられる。

転写開始段階において、RNAポリメラーゼがプロモーターと呼ばれるDNAの特異塩基配列に結合して転写を開始する。原核細胞のプロモーターにおいて、転写開始部位より10塩基対ほど上流に存在するプリブノーボックスと呼ばれる、プロモーターにより少しずつ異なっているが基本的塩基配列はTATTAATである塩基配列が実際にRNAポリメラーゼが結合する部位であると考え

られている。また、ある種のタンパク質がオペレーターと呼ばれる特異塩基配列に結合してプロモーターからの転写を促進する、または抑制する。真核細胞では、TATAボックスまたはゴールドバーグ・ホグネスボックスと呼ばれる転写開始部位より上流20～30塩基対の位置に見いだされる、プロモーターにより少しずつ異なっているが基本的塩基配列はTATA^A_T^A_T (AはAまたはTを表す)である塩基配列がRNAポリメラーゼIIの転写開始を規定していることが示唆されており、TATAボックスに結合して転写を調節する因子も分離されている。転写量の制御はTATAボックスより上流にあり、各々の遺伝子の転写制御に関与する固有の特異塩基配列が存在すると考えられている。さらにエンハンサーと呼ばれる転写効率を高める特異塩基配列もある。真核細胞のRNAポリメラーゼは3種類あり、通常のmRNA前駆体の合成にはRNAポリメラーゼII、リボソームRNAの合成にはRNAポリメラーゼI、5S及びtRNAの合成にはRNAポリメラーゼIIIが

関与し、いずれの場合もその転写に特異的な調節遺伝子が存在する。

転写延長段階においては、原核細胞の場合、オペロン内部に存在する転写終結シグナルとしてアテニューエーターと呼ばれる配列があり、遺伝子発現を調節している。動物細胞の場合アテニューエーターに対応する調節シグナルの報告はほとんどないが、SV40の後期遺伝子領域内に存在することが示唆されている。

転写終結段階においては、原核細胞の場合、ターミネーターと呼ばれる転写終結を指令する塩基配列がある。大腸菌においては、ターミネーターは大別して ρ と呼ばれるタンパク因子を必要とするもの(ρ 依存型)と必要としないもの(ρ 非依存型)の2種がある。また、 λ N転写終結タンパク等の関与によって、ターミネーターは複雑に制御されている。真核細胞については、研究は進みつつあるが、明らかにはなっていない。

このように、転写には、数多くの遺伝子上のシグナルが関与している。それらのシグナルの多く

はタンパク質である転写制御因子との相互作用によって機能している。これら転写の機構を解明、利用することは、遺伝子工学を用いた生命活動の制御や有用物の産生等に大きな進歩をもたらす、医薬、発酵等の分野への意義は大きい。

この重要な遺伝子における転写制御因子の解析にあたり、制御因子となるタンパク質の分離・精製が要求される。しかし、このような転写制御因子タンパク質は微量であり、精製が困難である。遺伝子と直接結合する転写制御因子タンパク質は、結合部位を含むDNA鎖をリガンドとするアフィニティクロマトグラフィーを用いた分離・精製が行われ、セルロースやアガロース等のゲル粒子が用いられてきた。しかし、市販されるこれらのゲルは、粒子径として数十 μ m以上のものがほとんどであり、粒子表面の総面積も小さく、また粒子径分布も広いため、上記のような用途に用いた場合、効率、再現性等において充分な性能を有しているとは言えない。さらに、カラムに充填した場合、これらのゲル粒子は数十倍以上の水を含有してい

るため、ゲル粒子の強度から考えると、高圧でカラム中に溶液を流すことは不可能であり、効率の悪いものである。

また、発明者らは非特異吸着性を持たない合成高分子粒子に転写制御因子であるタンパク質が特異的に結合する塩基配列を持った合成DNA鎖を化学結合したものを担体として用いることより、該転写制御因子であるタンパク質が容易に、収率良く得られることを見だし、1988年第37回高分子討論会において発表した。

(本発明が解決しようとする課題)

本発明者らは、鋭意研究の結果、表面がエポキシ基を有する樹脂から成る担体と特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列を有するDNA鎖が該エポキシ基を開環させて結合し、DNA鎖中の特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列部以外にはタンパク質を吸着しないDNA固定ミクロスフェアを用いることより、該特定のタンパク質がより容易に、より収率良く得られることを見だし、本発明を完成するに至った。

する以上は本発明においてはDNA鎖に結合するタンパク質に含める。また、実質的に、互いに結合して一つの因子として機能するタンパク質のみが得られるのであれば、複数種のタンパク質が得られても、本発明においては精製という。

本発明における担体は表面にエポキシ基を有し、さらにDNA鎖が該エポキシ基を開環させて結合した後において該担体表面にタンパク質が物理的吸着などにより実質的に吸着しないものである。表面がこれらの条件を満たしていれば担体の構造は制限されず、担体全体が一種類の重合体あるいは共重合体のみから成るものであっても、コア・シェル構造を持ったものでも構わない。

本発明における担体はタンパク質の精製においてカラム・クロマトグラフィに詰めて用いる場合、それに応じた強度、比重、大きさが要求される。

精製に用いるという目的から、単位体積当りに結合されるDNA鎖が多いものが好ましい。その理由からは、球状の担体は粒径が小さいものほど好ましい。粒径が小さいと、単位体積当りの表面

(課題を解決するための手段)

かくして本発明によれば、第1の発明として、表面がエポキシ基を有する樹脂から成る担体と特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列を有するDNA鎖が該エポキシ基を開環させて結合し、DNA鎖中の特定のタンパク質を特異的に結合する塩基配列部以外にはタンパク質を吸着しないDNA固定ミクロスフェアが提供され、第2の発明として、第1の発明のDNA固定ミクロスフェアに該DNA鎖を介して該タンパク質を吸着させ、他のタンパク質を除去した後、該タンパク質とDNA鎖を解離させる特定のタンパク質の精製法が提供される。

本発明のDNA固定ミクロスフェアを用いた精製法においては、複数のタンパク質がサブユニットとして結合して一つの因子として機能している場合に複数種のタンパク質が得られる場合があり、その場合DNA鎖には直接結合しないタンパク質が含まれる場合もある。そのようなタンパク質も他のタンパク質と結合して一つの因子として機能

積が大きくなり、DNA鎖が結合できる部位が増加するからである。粒径は50 μ m以下、好ましくは20 μ m以下のものが効果的である。

しかし、一方でアフィニティークロマトグラフィに用いることを考えた場合、粒径が3 μ m以下であると、カラムへの充填、保持が難しい。カラムからの担体の流出防止材に要求される条件を充すもので、粒径3 μ m以下のものの流出を防止できるものがないためである。ただし、粒径3 μ m以下であっても、DNA鎖にタンパク質を吸着させた後に試料と分離するパッチ法での分離・精製に利用できるものであれば、タンパク質の精製に用いることは可能である。

また、カラムに充填する場合において、比重が小さ過ぎると充填が困難である。

一方、パッチ式のタンパク質精製法を用いる場合は、遠心によりDNA固定ミクロスフェアと上清が容易に分離でき、また簡単に液中に分散できることが好ましいため、緩衝液などタンパク質の精製において溶媒として用いる液の比重をもとに

担体の比重を決めるようにすることが好ましい。担体表面として用いる樹脂の比重が好ましくない場合は、適当な比重のコアを担体表面として用いる樹脂でコートするコア・シェル構造の担体にするなど、担体全体としての比重が好ましくなるようにすればよい。

担体がコア・シェル構造を有し、コアとなる物質がタンパク質を吸着する物質である場合は、表面は完全にコーティングされていなければならない。さらに、精製操作中に表面の剥離等が起こらないように十分な強度が要求される。

一般的に粒子表面が疎水性表面である場合、各種タンパク質は、非特異的吸着を起こしやすい。従って、本発明においては、DNA鎖を結合させた後の担体表面が疎水性でないことが必須である。そのため、本発明のDNA固定ミクロスフェアの担体表面の樹脂は、グリシジル(メタ)アクリレート等のエポキシ基含有(メタ)アクリル酸エステルの重合体が例示される。担体表面にエポキシ基を有し、さらにDNA鎖が該エポキシ基を開環

物等を例示することができる。親水性のモノマーでなくても、エポキシ基含有(メタ)アクリル酸エステルモノマーとのコポリマーとしてタンパク質の非特異的吸着を担体表面に持ち込まないモノマーであれば、用いることができる。本発明においては、タンパク質の吸着の防止の観点から、グリシジルメタクリレート(以下、GMAという)のポリマーが特に好ましい。

本発明のDNA固定ミクロスフェアの担体の製造法は、製造された担体の表面がエポキシ基を有し、さらにDNA鎖が該エポキシ基を開環させて結合した後において該担体表面にタンパク質が物理的吸着などにより吸着しないものであれば、特に限定されない。しかし、重合開始剤として広く用いられているものの大半は、エポキシ基を含有するモノマーを重合させる際に、エポキシ基の多くを開環させてしまうため、本発明の担体の製造に用いることは好ましくない。本発明においては担体の表面の樹脂を製造するには、エポキシ基を含有するモノマーをエポキシ基を開環させずに重

わせて結合した後において該担体表面にタンパク質が物理的吸着などにより吸着しないものという条件を満たす限り、担体表面の樹脂はホモポリマーであっても、コポリマーであっても構わない。例えば、エポキシ基含有(メタ)アクリル酸エステルと親水性の高分子化合物のモノマーとのコポリマーであっても構わない。親水性の高分子化合物のポリマーとしては、エチレングリコール(メタ)アクリレート、トリエチレングリコール(メタ)アクリレート等のエチレンオキサイド含有(メタ)アクリル酸エステル、(メタ)アクリル酸ヒドロキシメチル、(メタ)アクリル酸ヒドロキシプロピル等のヒドロキシ基含有(メタ)アクリル酸エステル、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート等のアルキル(メタ)アクリル酸エステル、アクリルアミド、メタクリルアミド、ジアセトアクリルアミド、N-ヒドロキシエチルアクリルアミド等のモノエチレン性不飽和アミドモノマー、アクリロニトリル、メタクリロニトリル等のエチレン性不飽和ニトリル化合

合させる重合開始剤を用いる必要がある。そのような重合開始剤としては、例えば、水溶性アゾ系重合開始剤がある。水溶性アゾ系重合開始剤としては、2,2'-アゾビス(2-アミノプロパン)ジヒドロクロライド(以下、V50という)や4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、2,2'-アゾビス(N,N'-ジメチレンイソブチルアミジン)ジヒドロクロライド、2,2'-アゾビス(N,N'-ジメチレンイソブチルアミジン)、2,2'-アゾビス{2-メチル-N-[1,1-ビス(ヒドロキシメチル)-2-ヒドロキシエチル]プロピオンアミド}、2,2'-アゾビス{2-メチル-N-[1,1-ビス(ヒドロキシメチル)-エチル]プロピオンアミド}、2,2'-アゾビス[2-メチル-N-(2-ヒドロキシメチル)プロピオンアミド]、2,2'-アゾビス(イソブチルアミド)ジヒドレイトなどが例示される。

これらの水溶性アゾ系重合開始剤は、界面活性剤を用いないソーブフリー乳化重合法に用いることができる。この方法で製造された担体は担体表

面を汚染して、タンパク質の非特異的吸着性をもたらす可能性のある界面活性剤を用いないので好ましい。

担体表面の樹脂の重合においては、必要に応じて架橋剤なども用いることができる。架橋剤は担体表面への影響は小さい。そのため、疎水性の架橋剤を用いることもできるが、タンパク質の非特異的吸着性をもたらす可能性が少ない親水性の架橋剤を用いることが好ましい。親水性の架橋剤としては、エチレングリコールジメタクリレート、テトラメチレングリコールジメタクリレート、ジビニルベンゼンなどが例示される。

なお、水溶性アゾ系重合剤を用いたソーブフリー乳化重合法でGMAを重合することは可能ではあるが、条件が難しく、精製に用いる上で安定した品質の粒子を得ることは困難である。担体の表面としてGMAを用いる場合は、コア・シェル構造を有する担体にするのが好ましい。

本発明で担体に固定するDNA鎖は両端の一部を除き2本鎖である。1本鎖であると、粒子への

アミノ基とエポキシ基が反応してしまう可能性があるからである。エポキシ基の反応性をなくす方法としては、例えば、塩酸エタノールアミンで処理する方法がある。

このDNA固定ミクロスフェアを用いて、タンパク質を精製するが、目的のタンパク質を吸着させ、他のタンパク質を除去した後、特定のタンパク質とDNA鎖を解離させる方法は、特に限定されない。カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィでも、バッチ式でもかまわない。

この粒子はゲルに比べて硬質であり、また水を含みしていないので、カラムに充填する場合、高圧で溶液を流すことも可能であり、精製が効率よく行える。また、ゲルを用いた従来のカラム・クロマトグラフィでは大量の緩衝液が必要であり、その結果、精製したタンパク質を希釈することになる。それに対し、この粒子を用いた精製は、カラム・クロマトグラフィの場合の希釈倍率が低いのはもちろん、パンチ法の場合も粒子を沈降させる等の方法により、簡単に、かつ希釈せず、精製

固定時にDNA鎖の途中が固定に關与する可能性があり、また、タンパク質の非特異的吸着が起りやすい。

このDNA鎖は特定のタンパク質と特異的に結合できる塩基配列を有するものであり、対象となるタンパク質はDNA鎖と結合するタンパク質から選ばれ、そのタンパク質に応じて特定の塩基配列が選ばれる。精製の効率をよくするためには、特定のタンパク質と結合する特定の塩基配列が一つのDNA鎖中に複数含まれているものが好ましい。

特定の塩基配列と特異的に結合するタンパク質としては、転写制御因子タンパク質等がある。

担体表面へのDNA鎖の固定は、エポキシ基を開環させる共有結合によるものであり、DNA鎖の両端の一本鎖の部分のアミノ基と担体表面のエポキシ基を反応させてDNA鎖を固定する。

なお、DNA鎖を固定した後、エポキシ基の反応性をなくしておくことが好ましい。反応性を有するエポキシ基が残されていると、タンパク質の

タンパク質を得ることができる。これは、転写制御因子タンパク質等の微量タンパク質の精製においては大きな利点となる。

また、従来の転写制御因子の精製においては、細胞の核抽出物を用いた場合、ヘパリンセファロースのカラムを用いるなどの前処理が必要であった。しかし、本発明のDNA固定ミクロスフェアを用いた場合、そのような前処理は不要である。複数種のタンパク質が互いに結合して一つの因子として機能している場合などにおいては、一つの因子を構成するタンパク質の中には前処理によって除去されるものがある場合もあり、そのようなタンパク質は前処理を要する従来の精製法のみでは得ることができなかったが、本発明のDNA固定ミクロスフェアを用いる精製法においては、他のタンパク質と同時に得ることができる。

なお、本発明のDNA固定ミクロスフェアは、タンパク質の精製以外に、固定したDNA鎖と特異的に結合する特定のタンパク質の検出にも用いることができる。

(発明の効果)

かくして本発明のDNA固定ミクロスフェアは固定できるDNA鎖が多く、これを用いるタンパク精製法によれば、特定の塩基配列と特異的に結合する特定のタンパク質、特に転写制御因子タンパク質が、従来の方法と比較して、より効率よく、分離・精製することができる。

(実施例)

以下に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

蒸留水 120gにモノマーGMA 1.8g、モノマー・ステレン 1.2g、ジビニルベンゼン0.04gを加え、回転速度200rpmでスリーワンモーターで攪拌しながら、70℃で30分間素置換した。これにV500.08gを蒸留水10gに溶かして加え、70℃、2時間で重合させた。モノマーGMA 0.3gを加え、さらに22時間重合させた。重合後、反応液を50ml遠心管4本に分注し、20℃、13000rpmで10分間遠心分離して上澄みを除いたのち、蒸留水を加

え、再分散させ洗浄する操作を3回行った。こうして得られた粒子(以下、コート粒子という)は、平均粒子径0.173 μ m、比重は1.285と大きいため、沈降しやすく、簡単に分離、回収できる利点を持つ。

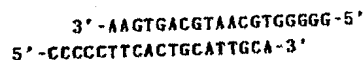
比較例1

蒸留水 120mlにモノマーGMA 3.0gとジビニルベンゼン0.04gを加え、回転速度200rpmでスリーワンモーターで攪拌しながら、70℃で30分間素置換した。これに重合開始剤として過硫酸カリウム0.08gを蒸留水10gに溶かして加え、70℃、24時間で重合させた。重合後、反応液を50ml遠心管4本に分注し、20℃、13000rpmで10分間遠心分離して上澄みを除いた後、蒸留水を加え、再分散させ洗浄する操作を3回行った。こうして得られた粒子(以下、GMA粒子という)は、平均粒子径は0.136 μ m、比重は約1.2であった。

実施例2

転写制御タンパク質E4TF3に認識される塩基配列を持った19bpのオリゴデオキシヌクレオチ

F



を合成機を用いて調製した。

このオリゴデオキシヌクレオチドに、 γ - 32 P-ATP、ATP、キナーゼを加え、37℃で1時間反応させ、5'末端をリン酸化し、アニール/リガーゼにより結合させて、5'末端の突出した約300bpのDNA鎖を調製した。

実施例3

2.5mgのコート粒子を10mMリン酸カリウム緩衝液(pH 8.0) 500 μ l中に分散させた後、遠心分離し上澄みを除き、実施例4で得たDNA鎖30 μ gを加えた10mMリン酸カリウム緩衝液(pH 8.0) 200 μ l中に再分散させた後、50℃で24時間反応させた。反応後、遠心分離し上澄みを除き2.5M塩化カリウム溶液で2回洗浄して、ペレット及び各洗液の放射線カウントを測定した。洗浄後のDNA固定ミクロスフェアに、1M塩酸エタノールアミン(pH 8.0) 1mlを加えて室温で24時間放置し、未反応のエポキシ基をマスクした。

作製したDNA固定ミクロスフェアをストック緩衝液(0.3M塩化ナトリウム、1mMエチレンジアミン四酢酸、0.02%ナトリウムアジド、10mMトリス塩酸(pH 8.0))によって3回洗浄し、同緩衝液0.2ml中に分散させ4℃で保存した。反応後の系の放射線カウントからDNA結合量を算出した。この結果からコート粒子に結合したDNA量は、11.2 μ gと算出された。

比較例2

実施例2で調製したDNA鎖を臭化シアン法にてポリGMA粒子に結合した。反応条件は、前もって検討した結果、比較例1で調製したポリGMA粒子に最も高効率でDNA鎖を結合できる反応温度2℃、pH11~12、臭化シアン/粒子=3.0g/240mgで結合させた。遠心により、DNA鎖が固定されたポリGMA粒子を回収した後、上澄み中の粒子に結合せずに残されたDNA鎖を 32 Pの放射線量から定量化し、DNA鎖の固定量を算出した結果、12mgのポリGMA粒子に対し10 μ gのDNA鎖が固定されたことがわかった。

担体表面の樹脂が同じモノマーからなる重合体であっても、エポキシ基を有しない樹脂を表面に持つ担体に比べて、エポキシ基を有する樹脂を表面に持つ担体は多くのDNA鎖を固定できることがわかった。

実施例 4

実施例 3 で得た DNA 固定ミクロスフェアを分散させたストック緩衝液 20 μ l (DNA 固定ミクロスフェア量は約 0.25 μ g) にし、1.5 μ l エッペンドルフチューブに入れ、蒸留水 100 μ l で 1 回、粒子洗浄用緩衝液 (50 μ M トリス塩酸 (pH 8.0)、1 μ M エチレンジアミン四酢酸、0.1 μ M DTT、20% グリセロール、0.1% p-n-オクチルフェニルエーテル) 100 μ l で 3 回洗浄した。

HeLa 細胞を 0.5 μ M HgCl_2 、1 μ M DTT を含む PBS で洗浄した後、細胞膜破損用緩衝液 (10 μ M HEPES (pH 7.9)、10 μ M KCl、1.5 μ M HgCl_2 、0.5 μ M DTT) で処理してホモジナイズし、遠心して上清を除去し、さらに核タンパク質抽出用緩衝液 (20 μ M HEPES (pH 7.9)、25% グリセロール、

0.42 μ M NaCl、1.5 μ M HgCl_2 、0.2 μ M EDTA、0.5 μ M PMSF、0.5 μ M DTT) で処理し、遠心分離し、上清を透析し、タンパク質濃度 8 μ g/ μ l の核粗抽出液を得た。

核粗抽出液 50 μ l に poly [dI-dC] 10 μ l 及び 10% p-n-オクチルフェニルエーテル 0.5 μ l を加え攪拌後 15 分間静置し、洗浄した DNA 固定ミクロスフェアに加え、30 分間静置して E4TF3 を DNA 固定ミクロスフェアの DNA 鎖に結合させた。この核粗抽出液や DNA 固定ミクロスフェア等の混液を 1.5 μ l エッペンドルフチューブ中で遠心分離し、上澄みを分取し、ペレットを粒子洗浄用緩衝液を 3 回洗浄した。その後、ペレットを溶出用緩衝液 (50 μ M トリス塩酸 (pH 8.0)、1 μ M エチレンジアミン四酢酸、1.0 μ M 塩化カリウム、1 μ M DDT、20% グリセロール、0.1% p-n-オクチルフェニルエーテル) 20 μ l で 3 回洗浄し、E4TF3 を精製した。SDS-PAGE により、E4TF3 の 6 種のタンパク質のバンドが、きわめて選択的に分離・精製されたことが確認された。

比較例 3

実施例 3 で得た DNA 固定ミクロスフェアを分散させたストック緩衝液 20 μ l (DNA 固定ミクロスフェア量は約 0.25 μ g) の代わりに、比較例 2 で得た DNA 固定ミクロスフェアを分散させたストック緩衝液 20 μ l (DNA 固定ミクロスフェア量は約 0.25 μ g) を用いるほかは実施例 6 と同様にして E4TF3 の精製を試みた。SDS-PAGE により、E4TF3 の 6 種のタンパク質のバンドが確認されたが、それ以外に少なくとも 5 種以上のタンパク質が検出された。

本願発明の DNA 固定ミクロスフェアは、従来の DNA 固定ミクロスフェアに比べて、タンパク質の精製においてより選択性が優れていることがわかった。